

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marijana Bašić

**ODREĐIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-DRB
ANALIZOM MIKROSATELITA D6S2878 U
HRVATSKOJ POPULACIJI**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Zorani Grubić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim kolegama i prijateljima bez kojih studij ne bi prošao tako zabavno.

Najviše hvala mojim roditeljima na razumijevanju i podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-DRB ANALIZOM MIKROSATELITA D6S2878 U HRVATSKOJ POPULACIJI

Marijana Bašić

Zavod za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12

U ovom radu analizirali smo alele mikrosatelita D6S2878, u svrhu određivanja haplotipova HLA-DRB, unutar skupine od 53 nesrodne zdrave osobe. Broj alela mikrosatelita D6S2878 u jednom haplotipu ovisi o tome koliki je broj gena DRB (aktivnih i pseudogena) u pojedinom haplotipu HLA. Analizom haplotipova HLA-DR1, DR10 te haplotipova DR52 uočili smo po dva alela mikrosatelita D6S2878. Kraći alel D6S2878 u haplotipu HLA-DR1 (alel D6S2878-136pb) odgovarao je alelu na pseudogenu DRB6, a duži alelima na lokusu DRB1 (alel D6S2878-154pb i alel D6S2878-161pb). U haplotipu HLA-DR52 alel D6S2878 koji je odgovarao alelima lokusa DRB1 (aleli D6S2878 dužine od 172pb do 206pb) bio je kraći od alela za lokus DRB3 (aleli D6S2878 dužine od 180pb do 214pb). Na haplotipovima HLA-DR51 i HLA-DR53 uočili smo po 3 alela mikrosatelita D6S2878. Kod haplotipova HLA-DR51 najkraći alel D6S2878 odgovarao je pseudogenu DRB6 (aleli D6S2878-144pb, 152pb, 154pb i 174pb) dok su duži aleli (od 176pb do 204pb) odgovarali alelima lokusa DRB1, odnosno aleli D6S2878 dužine od 180pb do 220pb alelima lokusa DRB5. Pseudogen DRB7 u haplotipovima HLA-DR53 imao je najkraće alele D6S2878 od 135pb, dok su dužine alela D6S2878 od 170pb do 194pb odgovarale alelima DRB1, a aleli D6S2878 od 176pb do 182pb alelima DRB4. Kod alela DRB1*08 uočen je samo jedan alel D6S2878 i to dužine od 170pb i 176pb.

(51 stranica, 8 slika, 19 tablica, 13 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DEFINITION OF HLA-DRB HAPLOTYPES BY MICROSATELLITE D6S2878 ANALYSIS IN A CROATIAN POPULATION

Marijana Bašić

Tissue typing centre, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12

In this study, we analyzed alleles at D6S2878 microsatellite among 53 unrelated subjects in order to define HLA-DRB haplotypes. Number of D6S2878 alleles detected in one haplotype depends on the number of DRB genes (active and pseudogenes) contained by a specific haplotype. Analysis of HLA-DR1, and HLA-DR52 haplotypes revealed two D6S2878 alleles. Shorter allele in HLA-DR1 haplotype (D6S2878-136bp) matched the allele on pseudogene DRB6, while longer matched the alleles on DRB1 locus (D6S2878-154bp and D6S2878-161bp). In HLA-DR52 haplotype D6S2878 allele which matched alleles on DRB1 locus (172bp-206bp) was shorter than allele which matched DRB3 locus (180bp-214bp). We observed three D6S2878 microsatellite alleles HLA-DR51 and HLA-DR53 haplotypes. The shortest allele in HLA-DR51 haplotype matched the allele on pseudogene DRB6 (D6S2878-144bp, 152bp, 154bp and 174bp), while the longer alleles (176bp-204pb) corresponded to alleles at DRB1 locus or in the case of alleles of the lenght 180bp-220bp to the alleles at DRB5 locus. Pseudogene DRB7 in HLA-DR53 haplotypes had the shortest D6S2878 allele (D6S2878-135bp), while alleles D6S2878 of the lenght 170bp-194bp matched alleles at DRB1 locus and alleles D6S2878 of the lenght 176bp-182bp matched alleles at DRB4 locus. Allele DRB1*08 displayed only one D6S2878 allele which could be either 170bp or 176bp long.

(51 pages, 8 figures, 19 tables, 13 references, original in: Croatian)

1. UVOD	1
1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI.....	1
1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA.....	2
1.1.2. GENETIKA SUSTAVA HLA.....	5
1.1.2.1. Geni HLA.....	6
1.1.2.2. Molekule HLA	8
1.2. REGIJA HLA-DRB	11
1.3. MIKROSATELITI HLA	13
1.4. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA I ANTIGENA HLA.....	16
1.4.1. PRAKTIČNA VAŽNOST	16
1.4.2. BIOLOŠKA VAŽNOST.....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. ISPITANICI.....	20
3.2. METODE ISTRAŽIVANJA	20
3.2.1. IZOLACIJA DNA	20
3.2.2. ODREĐIVANJE ALELA LOKUSA HLA-DRB1, DRB3, DRB4 I DRB5...	22
3.2.3. ODREĐIVANJE ALELA MIKROSATELITA D6S2878	25
3.2.3.1. Umnažanje alela mikrosatelita D6S2878.....	25
3.2.3.2. Analiza dužine alela mikrosatelita D6S2878.....	26
3.2.4. ANALIZA HAPLOTIPOVA HLA-DRB-D6S2878.....	27
4. REZULTATI	29
4.1. ANALIZA ALELA MIKROSATELITA D6S2878	29
4.2. ODREĐIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-DRB-D6S2878.....	36
5. RASPRAVA	44
6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA.....	50

1. UVOD

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI

Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. Major Histocompatibility Complex) nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3) i predstavlja sustav jakih antigena tkivne podudarnosti. To je sustav aloantigena koji u nepodudarnom primatelju uzrokuju iznimno jaku reakciju odbacivanja transplantata. Sustav tih gena, odnosno antigena, vrlo je raznolik, a geni za te antigene su vrlo polimorfni. Uloga gena MHC je u imunološkoj reakciji da predočuju strane antigene u obliku prepoznatljivom za limfocite T.

Ovaj sustav prvi je opisao imunolog George D. Snell četrdesetih godina prošlog stoljeća, Snell se bavio problemom odbacivanja organa u transplantacijskim reakcijama. Vjerovao je da sposobnost jedinke da odbaci tkivo druge jedinke određuju genetski faktori koje je nazvao genima tkivne podudarnosti (također poznati i kao transplantacijski geni). Istraživanja je proveo križanjem sojeva miševa, sve dok nije utvrdio da specifična grupa gena ima glavnu ulogu u kontroliranju otpornosti na tkivne transplantate, taj sustav gena nazvao je MHC-om (Snell, 1980.).

Kod miša sustav MHC naziva se H-2 (engl. Histocompatibility Antigen 2), dok je kod čovjeka uobičajeni naziv HLA (engl. Human Leukocyte Antigen). Sustav HLA otkrio je francuski imunolog Jean Dausset 50-ih godina prošlog stoljeća. Uočio je da kod nekih bolesnika koji su primili transfuziju odgovarajuće krvne grupe dolazi do transfuzijske reakcije. Kako nije došlo do aglutinacije eritrocita bilo je očito da postoje neki drugi antigeni odgovorni za transfuzijsku reakciju, tj. da se radi o leukocitnim antigenima.

Regija HLA se iz funkcionalnih razloga dijeli u tri skupine: HLA razred I, HLA razred II i HLA razred III. Skupine gena HLA razreda I i razreda II su mnogo važnije, jer kodiraju molekule koje imaju ključnu ulogu u preradi i predočavanju stranih antigena,

dok skupina gena HLA razreda III kodira molekule koje sudjeluju u imunološkoj reakciji, ali nemaju središnju imunoregulacijsku ulogu kao molekule HLA razreda I i II.

Kod čovjeka molekule HLA razreda I nalaze se na membrani većine stanica organizma, tj. kod onih koje imaju jezgru, a molekule HLA razreda II nalaze se samo na membranama profesionalnih predočnih stanica: limfocitima B, makrofagima i dendritičnim stanicama.

Sustav HLA sudjeluje u brojnim važnim funkcijama kao što su regulacija imunološkog prepoznavanja stranog antigena, kontrola interakcije i suradnje limfoidnih stanica tijekom imunološke reakcije upravljene protiv ciljane stanice tj. antigena, regulacija proizvodnje specifičnih antitijela, regulacija proizvodnje komplementa te nekih drugih medijatora imunološke reakcije i kontrola sinteze tkivnih antigena.

1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA

Glavne osobine sustava HLA su: nepravilna tkivna zastupljenost, polimorfizam, crossing-over, pravilna segregacija, genska neravnoteža udruživanja, križna reaktivnost, te rasna i populacijska specifičnost.

Nepravilna tkivna zastupljenost znači da su molekule HLA u velikom broju zastupljene na limfatičkom tkivu i na staničnim membranama organa i tkiva koja sudjeluju u imunološkoj reakciji. Nasuprot tome, njihova je zastupljenost slaba na mišićnom i masnom tkivu, te središnjem živčanom sustavu.

Polimorfizam ovog sustava odnosi se na postojanje velikog broja alela na lokusima, kao i veliki broj lokusa. Dva su moguća objašnjenja velikog polimorfizma: ili je sustav HLA imao brži razvoj nego drugi genetski sustavi ili je ova pojava posljedica prirodne selekcije temeljene na stvaranju alela HLA otpornih na uzročnike bolesti. Smatra se da je raznolikost HLA rezultat selekcije tijekom koje su određeni haplotipovi HLA bili uspješniji u prepoznavanju i obrani od uzročnika bolesti. Sustav HLA stoga predstavlja najraznolikiji genetski sustav u čovjeka. Do danas otkriveni aleli HLA prikazani su u tablici 1 (<http://hla.alleles.org>).

Tablica 1. Broj poznatih alela HLA*

HLA razred I		HLA razred II			
lokus	broj alela	lokus	broj alela	lokus	broj alela
A	853	DRA1	3	DQA1	34
B	1249	DRB1	659	DQB1	99
C	463	DRB2	1	DPA1	27
E	9	DRB3	50	DPB1	135
F	21	DRB4	13	DMA	4
G	44	DRB5	18	DMB	7
		DRB6	3	DOA	12
		DRB7	2	DOB	9
		DRB8	1		
		DRB9	1		
ukupno 2639		ukupno 1078			
Σ 3717					

*(podaci do srpnja 2009.)

Svaki pojedinac u svom genotipu sadrži dva haplotipa HLA, a crossing-over može uzrokovati promjenu haplotipa iako se on događa vrlo rijetko. Razlog tome je što je udaljenost između lokusa HLA vrlo mala, a poznato je da se crossing-over događa češće što su lokusi dalje.

Segregacija gena HLA je pravilna i prati Mendelov zakon o segregaciji alela, tj. kroz generacije imamo prisutnu istu količinu gena u pojedinoj populaciji, odnosno jednak je broj pozitivnih i negativnih potomaka za praćeni gen.

Sljedeća važna osobina gena HLA je genska neravnoteža udruživanja (engl. linkage disequilibrium). To je pojava da se aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju u istom haplotipu češće nego što bi to bilo za očekivati na temelju njihove pojedinačne učestalosti. Jedan takav primjer je haplotip HLA-A25, -B18, učestalost ovog haplotipa izračunata na temelju pojedinačnih učestalosti antigena HLA-A25 i antigena HLA-B18 bila bi puno manja nego što se taj haplotip javlja u populaciji upravo zbog neravnoteže udruživanja.

Križna reaktivnost gena HLA je fenomen koji se temelji na činjenici da molekula HLA ima privatnu i opću specifičnost. Prema tome imunizacijom možemo izazvati imunološku reakciju upravljenu ne samo protiv antigena HLA koji je potaknuo reakciju nego i protiv drugih antigena HLA koji nose epitope slične ili iste opće specifičnosti s antigenom HLA uzročnikom imunizacije. Križnu reaktivnost uglavnom nalazimo među antigenima HLA istog lokusa (tablica 2).

Tablica 2. Križna reaktivnost antigena HLA

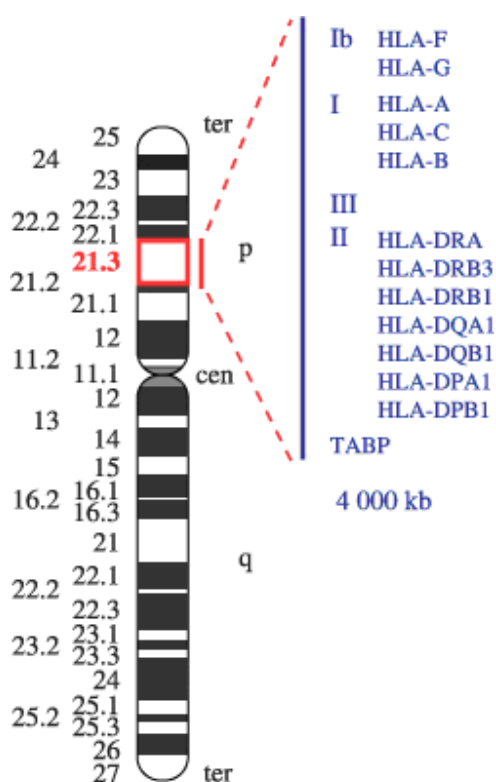
CREG	ANTIGENI HLA-
A1	A1, 3, 11, 36, 23, 24, 29, 30, 31, 80
A2	A2, 68, 69, 23, 24, B57, 58
A10	A11, 25, 32, 26, 33, 34, 66, 68, 69, 74
A19	A29, 30, 31, 32, 33, 74
B5	B18, 35, 51, 52, 53, 49, 50, 57, 58, 62, 63, 71, 71, 75, 76, 77, 78
B7	B7, 27, 2708, 2712, 2718, 13, 37, 41, 42, 47, 48, 54, 55, 56, 60, 61, 73, 81
B8	B8, 0802, 0803, 18, 38, 39, 59, 64, 65, 67
B12	B13, 37, 41, 44, 45, 49, 50, 47, 60, 61
B15	B57, 58, 62, 63, 71, 72, 75, 76, 77
Bw4	Bw4, A23, 24, 25, 32
Bw6	Bw6

CREG engl. cross reactive group

Sustav HLA ispoljava rasnu i populacijsku specifičnost što znači da se unutar pojedine populacije javlja samo dio alela i haplotipova. Tako npr. u Hrvatskoj je od 35 različitih alela HLA-B*27, samo nekoliko njih uočeno (HLA-B*2702, B*2705, B*2714, B*2704).

1.1.2. GENETIKA SUSTAVA HLA

Regija HLA zauzima oko 4 milijuna parova baza DNA, što odgovara veličini genoma bakterije *E. coli*. Unutar tog područja nalazi se 239 gena, od čega je 45 gena HLA i njima srodnih gena, ostalih 194 gena su geni non-HLA. Geni sustava HLA podijeljeni su u četiri regije: regija HLA razreda I smještena je najbliže telomeri i sadrži gene HLA razreda I, regija HLA razreda III (ili centralna regija), regija HLA razreda II (smještena bliže centromeri) i produžetak regije HLA razreda II (*slika 1*).



Slika 1. Mapa regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6

Pojedina kombinacija alelnih oblika gena HLA na jednom kromosomu naziva se haplotip. Po jedan haplotip nasljeđuje se od svakog roditelja i izražava kodominantno na staničnoj membrani. Svaki se haplotip sastoji od više gena HLA razreda I i razreda II.

1.1.2.1. Geni HLA

Geni HLA mogu biti kodirajući, nekodirajući, geni „kandidati“ (geni za koje se pretpostavlja da imaju proteinski produkt) i pseudogeni. Klasični geni HLA nalaze se unutar regije HLA razreda I i razreda II (tablica 3).

Tablica 3. Broj svih skupina gena HLA po regijama HLA

	Kodirajući	Kandidati	Nekodirajući	Pseudogeni	Ukupno
Geni HLA razreda I	6	0	0	13	19
Geni HLA razreda II	11	2	0	6	19
Geni MIC	2	2	0	5	7
Ukupno za gene HLA	19	2	0	24	45
Geni non-HLA	111	15	4	64	194
Ukupno	130	17	4	88	239
Regija HLA razreda I	41	12	3	66	122
Regija HLA razreda III	58	2	0	2	62
Regija HLA razreda II	16	3	0	15	34
Produžetak regije HLA razreda II	15	0	1	5	21

Geni HLA razreda I podijeljeni su u tri skupine: klasični geni HLA razreda I (HLA-A; -B, -Cw), neklasični geni HLA razreda I (HLA-E, -F, -G) i pseudogeni ili dijelovi gena (HLA-H, -J, -K, -L). Grupirani su unutar tri odvojena duplicirana bloka, a blokovi su međusobno odvojeni velikom skupinom gena non-HLA. Geni HLA razreda I koji kodiraju α lanac građeni su od 8 egzona, kodirajuće DNA, između kojih se nalaze introni, nekodirajuća DNA. Egzon 1 kodira vodeći (engl. leader) peptid, egzoni 2 i 3 kodiraju domenu $\alpha 1$ i $\alpha 2$, egzon 4 domenu $\alpha 3$, egzon 5 transmembransku domenu dok egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku domenu.

U području gena HLA razreda I, između gena HLA-Cw i HLA-A nalazi se nekoliko gena koji sliče genima HLA, još više takvih gena ima telomerno od gena HLA-

A. Ti su geni uglavnom nepolimorfni, a neki su pseudogeni. Tu pripadaju geni za molekule CD1 koje su izražene na dendritičkim stanicama, monocitima i nekim timocitima, a vežu se s β_2 -mikroglobulinom i sudjeluju u predočavanju antigena limfocitima T. Također tu spadaju i geni MIC (engl. MHC I related chain), geni MICA i MICB koji su kodirajući geni, a geni MICC, MICD, MICE, MICE i MICG su pseudogeni. Njihovo prepisivanje potiču brojni stanični podražaji (npr. toplinski šok, stresni uvjeti), a produkti tih gena izraženi su na fibroblastima i epitelnim stanicama crijeva. Sudjeluju u nespecifičnom imunološkom odgovoru, a vežu se za receptore na stanicama NK, limfocitima T koji nose receptore $\gamma\delta$ i nekim citotoksičnim limfocitima T.

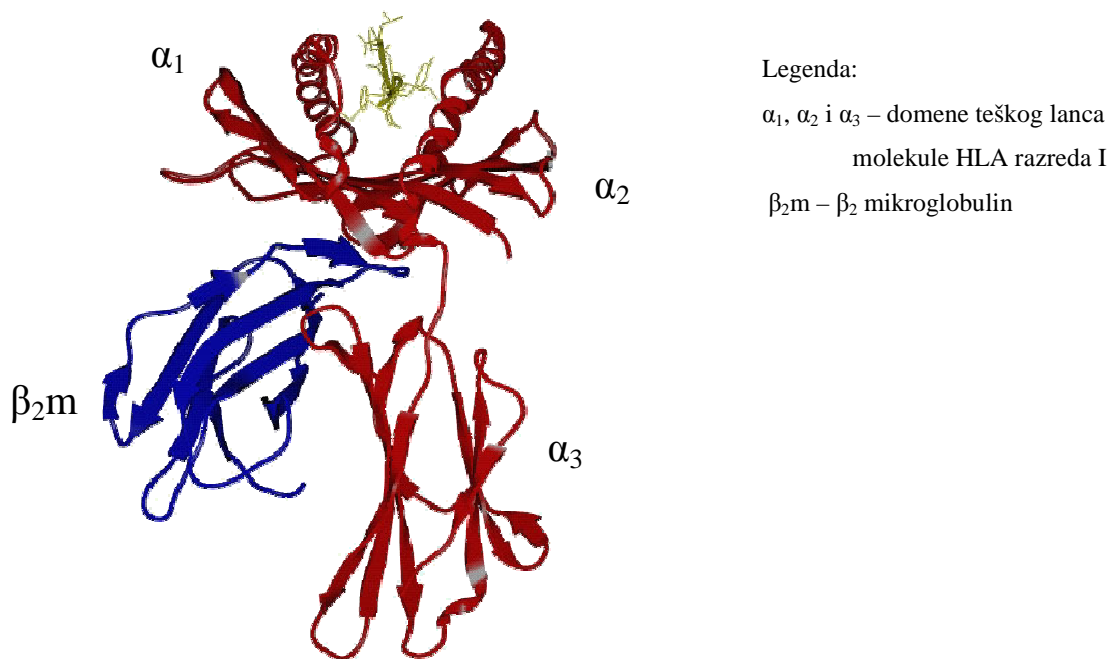
Regija HLA razreda III smještena je između regije HLA razreda I i regije HLA razreda II, geni te regije smješteni su izuzetno blizu te dolazi i do mjestimičnog preklapanja gena. Regija sadrži 75 gena koji kodiraju neke komponente komplementa C2, C4 i faktor B, zatim gene za bjelančevine toplinskog šoka i za neke važne citokine.

Regija HLA razreda II podijeljena je na šest subregija: subregija DM, subregija DO, subregija DN, subregija DP, subregija DQ i subregija DR. Klasični geni HLA razreda II (HLA-DP, -DQ, -DR) kodiraju α i β lanac molekula HLA razreda II koji su prisutni na antigen prezentirajućim stanicama. Geni HLA razreda II koji kodiraju α lanac građeni su od 5 egzona između kojih su raspoređeni introni. Egzon 1 kodira vodeći peptid, egzoni 2 i 3 dvije izvanstanične domene, a egzon 4 transmembransku i citoplazmatsku domenu. Geni HLA razreda II koji kodiraju β lanac građeni su od 6 egzona među kojima su introni. Kod β lanca egzon 1 kodira vodeći peptid, egzoni 2 i 3 dvije izvanstanične domene, egzon 4 transmembransku, a egzon 5 citoplazmatsku domenu. U području gdje se nalaze geni HLA razreda II smješteni su i geni čiji su produkti prijeko potrebni za konačni ustroj molekula HLA razreda I. To su dva gena nazvana TAP1 i TAP2 (engl. Transport Associated with antigen Processing) koji kodiraju dijelove crpke koja prenosi prerađene antigene iz citosola u unutrašnjost endoplazmatske mrežice gdje se spajaju s novostvorenim molekulama HLA razreda I. Također se unutar ove regije nalaze i geni za proteosome LMP2 i LMP7 (engl. Low Molecular weight Proteosome), koji kodiraju kompleks citoplazmatskih proteaza koje cijepaju antigene u citoplazmi na peptide koji će se spojiti s molekulama HLA razreda I.

1.1.2.2. Molekule HLA

Molekule HLA su transmembranski proteini koji su prisutni na svim stanicama kod ljudi osim na eritrocitima, a njihove izvanstanične domene imaju žljebove u koje sjedaju peptidi. Ti peptidi nastaju unutarstaničnom razgradnjom proteina, odnosno preradbom stranih, ali i nepotpunih vlastitih proteinskih antigena, pa se vežu za novosintetizirane molekule HLA prije negoli budu izloženi na površini stanica, tj. prezentirani limfocitima T.

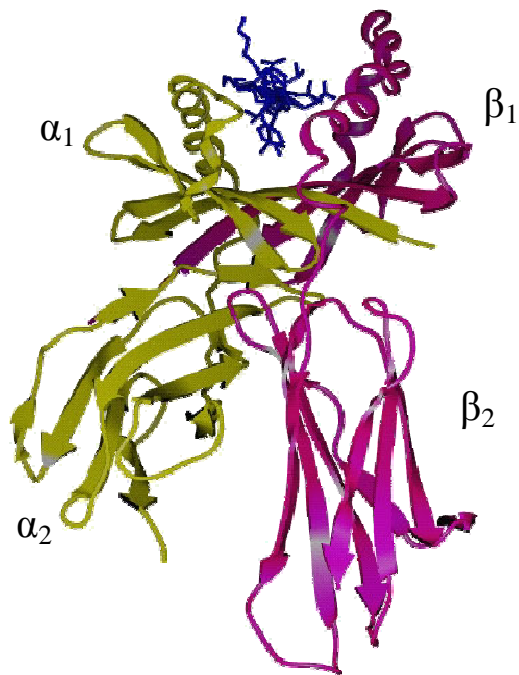
Molekula HLA razreda I sastoji se od dvaju polipeptidnih lanaca: α lanac (45 kD, teški lanac), koji određuju geni HLA razreda I i β lanac (12 kD, laki lanac), koji se naziva β_2 -mikroglobulin, monomorfan je, a kodira ga gen na kromosomu 15 (*slika 2*). Lanac β se nekovalentno veže uz α lanac, a nalazi se slobodno u serumu. Lanac α se sastoji od tri glikolizirane izvanstanične domene, hidrofobnog transmembranskog dijela te završnog hidrofilnog dijela u citoplazmi, dok se β lanac nalazi izvan stanice. Cijela molekula HLA razreda I može se podijeliti na četiri dijela: dio koji veže peptid (domene α_1 i α_2), dio koji sliči imunoglobulinu (domene α_3 i β_2 -mikroglobulin), transmembranski i citoplazmatski dio. Najvažniji dio molekule je onaj koji veže peptid, a sastoji se od 180 aminokiselina stereokemijski podjeljenih u dijelove α_1 i α_2 , koji zajedno tvore pravilno građenu pukotinu u koju se smješta prerađeni peptid. Krajevi pukotine za vezanje peptida su zatvoreni, te se stoga u pukotinu mogu vezati peptidi dužine 8–10 aminokiselina, i to tako da se vežu svojim amino i karboksi krajevima za rubove pukotine. Dio molekule α_3 sličan je imunoglobulinu i sadržava vezno mjesto za molekulu CD8 na citotoksičnim limfocitima T. Laki lanac, kod svih molekula HLA razreda I, također je građen kao konstantni dio imunoglobulina, a nužan je za izražavanje molekule HLA razreda I na staničnoj površini. Citoplazmatski dio molekule HLA razreda I sadržava slijed bazičnih aminokiselina koje sidre molekulu HLA u membrani.



Slika 2. Trodimenzionalna struktura molekula HLA razreda I

Molekule HLA razreda II izražene su samo na antigen prezentirajućim stanicama: limfocitima B, makrofagima i dendritičkim stanicama, a funkcija im je prezentacija izvanstaničnih antigena pomoćničkim limfocitima T (*slika 3*). Te molekule su heterodimeri, građeni od dvaju međusobno sličnih, nekovalentno vezanih lanaca, težeg α lanca (32–34 kD) i lakšeg β lanca (29–32 kD), oba lanca su polimorfna. Molekula se također može podijeliti na četiri dijela: dio koji veže peptid (domena α_1 i β_1), dio koji sličí konstantnom dijelu imunoglobulina (domena α_2 i β_2), transmembranski i citoplazmatski dio. Izvanstanični dijelovi lanaca α i β funkcijski se mogu podijeliti u podjedinice od po 90 aminokiselina, α_1 i α_2 , odnosno β_1 i β_2 , α_1 i β_1 zajedno tvore dio koji veže antigenski peptid. Dio koji veže peptid tvori pukotinu građenu od pravilnih struktura podjedinica α_1 i β_1 , samo što su ovdje krajevi pukotine otvoreni, tako da vezani peptidi mogu stršati izvan pukotine. Stoga se u pukotinu molekule HLA razreda II mogu vezati veći peptidi, od 10–30 aminokiselina (u prosjeku 14). Dio molekule HLA razreda II koji sličí konstantnom

dijelu imunoglobulina važan je za nekovalentno povezivanje lanaca α i β . Molekula CD4 na pomoćničkom limfocitu T veže se na podjedinicu β_2 molekule HLA razreda II.



Legenda:

α_1 i α_2 – domene težeg lanca α
molekule HLA razreda II

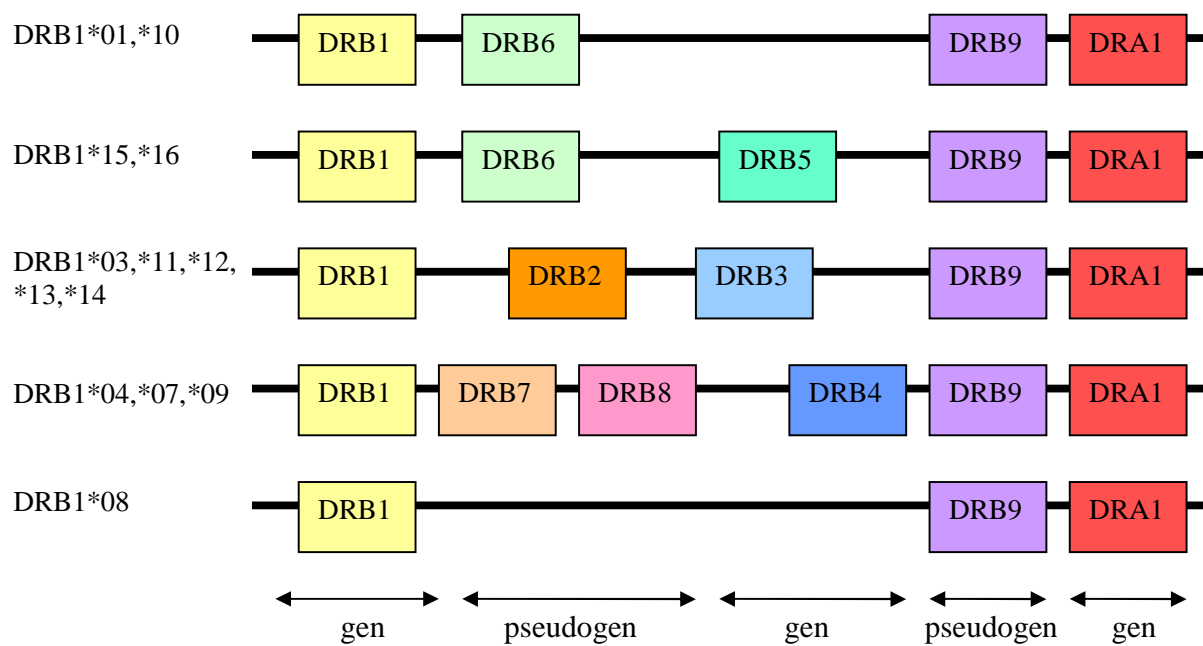
β_1 i β_2 – domene lakšeg lanca
molekule HLA razreda II

Slika 3. Trodimenzionalna struktura molekula HLA razreda II

1.2. REGIJA HLA-DRB

Dio regije HLA razreda II koji kodira molekule HLA-DR složeniji je od ostalih koji kodiraju ostale molekule HLA razreda II, jer postoji nekoliko funkcionalnih gena za β lanac kao i nekoliko pseudogena. Različite kombinacije gena za β lanac nazivaju se haplotipovi HLA-DRB, to je najnestabilnija regija HLA razreda II.

Kod ljudi postoji pet glavnih haplotipskih skupina HLA-DRB (*slika 4*). Na krajevima subregije HLA-DR nalaze se geni koji su zajednički svim haplotipovima: na 5' kraju nalazi se gen za β lanac HLA-DRB1, a na 3' kraju gen za α lanac HLA-DRA1. Proksimalno od gena HLA-DRA1 nalazi se pseudogen HLA-DRB9 za kojeg se smatra da je također zajednički za sve haplotipove. Između gena HLA-DRB1 i HLA-DRB9 mogu se nalaziti drugi geni HLA-DRB. Ti geni mogu biti funkcionalni ili pseudogeni. U funkcionalne gene ubrajamo gene HLA-DRB3, -DRB4 i -DRB5, a pseudogeni su HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7 i -DRB8. Svaki haplotip sadrži gen HLA-DRB1, a prisutnost ostalih funkcionalnih gena (HLA-DRB3, -DRB4 ili -DRB5) ovisi o tome koji je alel na lokusu HLA-DRB1. U haplotipu koji obuhvaća alele HLA-DRB1*01 i -DRB1*10 (serološka skupina DR1 i DR10) ne dolazi više niti jedan funkcionalni gen, ali je prisutan pseudogen DRB6, uz alele HLA-DRB1*15 i -DRB1*16 (serološka skupina DR51) dolazi još funkcionalni gen DRB5 i pseudogen DRB6. Uz alele HLA-DRB1*03, -DRB1*11, -DRB1*12, -DRB1*13 i -DRB1*14 (serološka skupina DR52) prisutan je funkcionalni gen DRB3 i pseudogen DRB2. S druge strane uz alel HLA-DRB1*08 ne dolazi niti jedan drugi gen DRB osim već prije navedenog pseudogena DRB9. Aleli HLA-DRB1*04, -DRB1*07 i -DRB1*09 (serološka skupina DR53) u svom haplotipu DRB imaju funkcionalni gen DRB4 i pseudogene DRB7 i DRB8. Pojedini haplotip HLA-DR može imati maksimalno tri aktivna gena (HLA-DRA1, -DRB1 i jedan od 3 gena tj. DRB3, DRB4 ili DRB5).



Slika 4. Raspored gena HLA-DR unutar pet glavnih haplotipskih skupina

1.3. MIKROSATELITI HLA

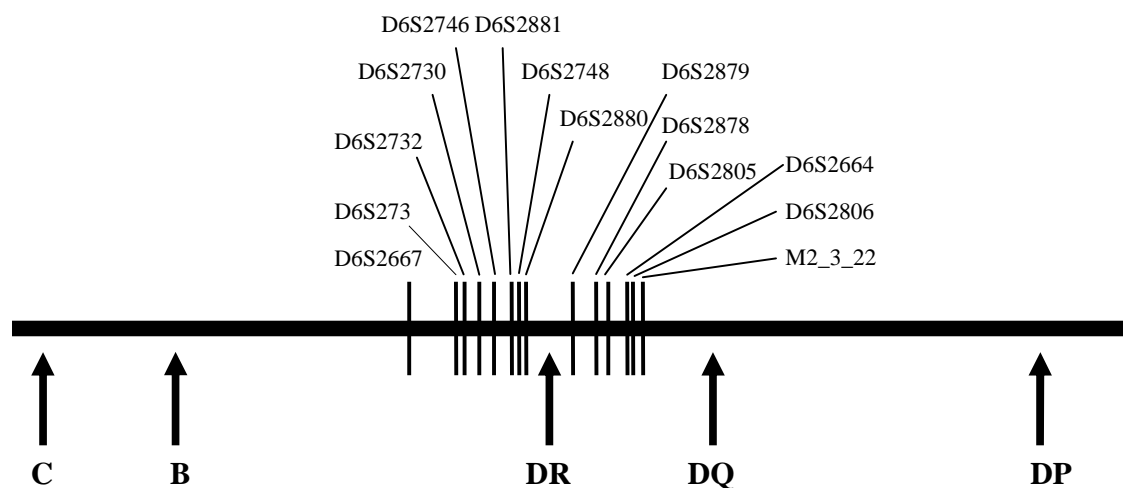
Mikrosateliti ili kratka uzastopna ponavljanja DNA (engl. Short Tandem Repeats - STR) su ponavljajući kratki motivi DNA dužine od jednog do šest nukleotida. Nalaze se u eukromatinskim regijama eukariota. Ponavljajuće sekvence su jednostavne, a mogu biti sastavljene od dva, tri ili četiri nukleotida, koji se mogu ponavljati 10-100 puta. Motiv ponavljanja sastoji se od A, CA, AAAN, AAN ili AG ponavljanja, pri čemu N označava bilo koju bazu. Najčešći mikrosateliti su dinukleotidna ponavljanja motiva CA, a javljaju se na svakih 30 do 60 kilobaza eukromatinske regije u genomu. Mikrosateliti se pojavljuju posvuda u genomu, a obilježava ih visok stupanj raznolikosti, visoka stopa mutacija i prate Mendelov zakon o kodominantnom nasljeđivanju. Koriste se kao biljezi za genetičko mapiranje, izradu evolucijskih stabala i u populacijskoj genetici.

Prvi mikrosateliti unutar regije HLA spominju se 90-tih godina prošlog stoljeća, od tada ih je otkriveno više od 300 unutar ove regije (Gorraud i sur., 2004.). Dužina im varira između 84 i 356 parova baza s dominacijom CA ponavljanja, a broj poznatih alela iznosi 2-19. Odlikuje ih visok stupanj raznolikosti i prosječan broj alela od 8,5. Iz tog razloga nose svojstvo informativnih genetskih biljega. Istraživanja mikrosatelita pokazala su postojanje neravnoteže udruživanja alela HLA i alela mikrosatelita HLA. Rezultat te povezanosti je primjena mikrosatelita HLA u istraživanjima od evolucije (Bergstrom i sur., 1999.), pa do povezanosti gena HLA s bolestima npr. reumatoidni artritis (Singal i sur., 1998.), sistemski eritematozni lupus (Graham i sur., 2002.), ankilozatni spondilitis (Yabuki i sur., 1999.), narkolepsija (Ando i sur., 1997.) i brojne druge bolesti.

Nisu svi mikrosateliti HLA podjednako zanimljivi i predmet istraživanja, no treba reći da je najveći broj mikrosatelita HLA istraživani unutar studija koje su se odnosile na različite bolesti povezane s regijom HLA.

Mikrosateliti HLA mogu se svrstati u tri razreda: razred A, razred B i razred C. U razred A ubrajaju se mikrosateliti s pravilnim ponavljanjima jedinstvenog niza nukleotida (npr. ...CACACACACACA...). U razred B ubrojeni su oni mikrosateliti koji imaju nepravilna ponavljanja niza nukleotida (npr. ...CACACTCCACACACA...). Takva ponavljanja nastaju adicijom ili supstitucijom nukleotida unutar ponavljajućeg slijeda. U

razred C svrstani su mikrosateliti sa složenim ponavljanjima, tj. kod njih su otkrivena dva ili više različitih ponavljanja nukleotida (npr. ...CACACACACATGCTAGTGTGTGTGT...). Također prema broju ponavljajućih nukleotida mikrosateliti se dijele na di-, tri-, tetra-, penta- ili heksanukleotide. Prema nomenklaturi mikrosateliti HLA se označavaju imenom D6S**** (npr. D6S2878, D6S2664 itd.), iako se u nekim slučajevima radije koriste povijesna imena (npr. TNFa). Broj „6“ označava da se mikrosatelit nalazi na kromosomu 6, a broj npr. 2878 govori o kojem je mikrosatelitu riječ.



Slika 5. Shematski prikaz položaja nekih od mikrosatelita unutar regije HLA

Neki od mikrosatelita unutar regije HLA-DR su mikrosateliti D6S2667, D6S2732, D6S2734 koji se nalaze između gena NOTCH4 (engl. Notch Homolog 4) i gena TSBP (engl. Testis Specific Basic Protein). Mikrosatelit D6S2667 svrstan je u razred A mikrosatelita, dužine je 186 pb, sastavljen od dinukleotidnog ponavljanja AT, dok se mikrosateliti D6S2732 i D6S2734 ubrajaju se u razred B mikrosatelita. Mikrosatelit D6S2732 sadrži dinukleotidno ponavljanje TC dužine 236 pb, istu dužinu susrećemo i kod mikrosatelita D6S2734 koji je dinukleotidno ponavljanje AT.

Mikrosatelit D6S2730 nalazi se između gena BTNL2 (engl. Butyrophilin-like 2) i gena HLA-DRA1, ubraja se u razred A mikrosatelita, a sastoji se od pentanukleotidnog ponavljanja AAATA dužine 280 pb.

Između gena HLA-DRA1 i HLA-DRB3 nalazi se mikrosatelit D6S2746 koji se sastoji od pentanukleotidnog ponavljanja AAAAC dužine 147 pb, a svrstan je u razred A mikrosatelita.

Unutar gena HLA-DRB3 nalazi se mikrosatelit D6S2881, smješten u razred C, sastavljen od dinukleotidnog ponavljanja CA dužine 173 pb.

Između gena HLA-DRB3 i HLA-DRB1 smješteni su mikrosateliti D6S2748, sastavljen od pentanukleotidnog ponavljanja AAAAG dužine 289 pb, mikrosatelit razreda A i D6S2880, sastavljen od dinukleotidnog ponavljanja AT dužine 150 pb.

Unutar gena HLA-DRB1 nalazi se mikrosatelit D6S2879 koji je svrstan u razred A mikrosatelita, sastavljen je od dinukleotidnog ponavljanja GT dužine 283 pb.

Između gena HLA-DRB1 i HLA-DQA1 nalazi se nekoliko mikrosatelita. Mikrosatelit D6S2805 svrstan je u razred B, sastavljen je od tetranukleotidnog ponavljanja AAAT dužine 209 pb. Mikrosateliti D6S2664 i D6S2806 su svrstani u razred C, sastavljeni su od tetranukleotidnog ponavljanja AAAG, ali su različite dužine, prvi 282 pb, a drugi 330 pb. Mikrosatelit M2_3_22 spada u razred A, sastavljen je od trinukleotidnog ponavljanja AAT dužine 174 pb.

Jedan mikrosatelit je u posljednje vrijeme pobudio veliko zanimanje, mikrosatelit D6S2878. Nalazi se unutar svih funkcionalnih gena HLA-DRB (DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5) i pseudogena DRB6 i DRB7, i to na početku introna 2, u neposrednoj blizini egzona 2. Razlog interesa za ovaj mikrosatelit leži u činjenici da predstavlja potencijalni genetski biljeg za uspostavu protokola za određivanje haplotipova HLA-DRB (Doxiadis i sur., 2007.). Mikrosatelit D6S2878 ubraja se u razred C mikrosatelita, sastavljen je od dinukleotidnog ponavljanja CA, koji dominira u ponavljajućoj sekvenci, dužine 300 pb. Odlikuje ga visok stupanj polimorfizma. Ovaj mikrosatelit je također zanimljiv i s evolucijskog stajališta, jer je osim kod ljudi prisutan i kod majmuna novog i starog svijeta, pa se mikrosatelit D6S2878 može koristiti u filogenetskim analizama.

1.4. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA I ANTIGENA HLA

Proučavanje gena i antigena HLA glavno je područje rada imunogenetike. Razlog tome je činjenica da poznavanje tkivnih antigena kod ljudi ima više izravnih praktičnih primjena, a sam sustav HLA pokazao se glavnim regulacijskim sustavom u imunologiji. Važnost sustava HLA može se svesti na praktičnu i biološku važnost.

1.4.1. PRAKTIČNA VAŽNOST

Antigeni tj. geni HLA imaju praktičnu važnost pri presađivanju tkiva i organa, u povezanosti s određenim bolestima, te u antropološkim studijama, pri identifikaciji osoba kao i pri isključivanju očinstva. Uspjeh presađivanja tkiva i organa u kliničkoj praksi najčešće odgovara stupnju podudarnosti HLA između primatelja i davatelja presatka. U nekim slučajevima može se povezati pojedini alel HLA s podložnošću za određenu bolest. To znači da posjedovanje određenog alela HLA povisuje rizik da se kod nositelja tog alela HLA pojavi ta bolest. Moguće je izračunati relativni rizik da nositelj određenog alela HLA, u odnosu na osobu koja taj alel nema, razvije bolest. Gotovo sve bolesti koje se mogu povezati s alelima HLA pripadaju u skupinu autoimunih bolesti, neke od njih prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Primjeri povezanosti alela HLA i pojedinih bolesti

Bolest	Alel HLA s kojim se bolest povezuje	Relativni rizik
Ankilozatni spondilitis	B27	90-100
Akutni uveitis	B27	10,04
Behcetova bolest	B51	3,8
Psorijatični artritis	B57, B39	2,6
Goodpasturov sindrom	DR2	15,9
Multipla skleroza	DR2	4,8
Autoimuna hipertireoza	DR3	3,7
Miastenija gravis	DR3	2,5
Sistemni eritematozni lupus	DR3	5,8
Šećerna bolest tip 1	DR3, DR4, DR3/ DR4 heterozigoti	5-25
Reumatoidni artritis	DR4	4,2
Glutenska enteropatija	DR3, DR5/DR7 heterozigoti	11,6
Pemphigus vulgaris	DR4	14,4
Hashimotoov tireoiditis	DR5	3,2

Određivanjem gena, odnosno antigena HLA u populacijama koje se razlikuju rasom, mjestom, načinom stanovanja itd., mogu se izvoditi važni zaključci o seobama i njihovom miješanju. Pri tom se geni HLA koriste kao identifikacijska slika pojedinca ili populacije. S obzirom na ogromni polimorfizam gena HLA i zbog toga visoke specifičnosti haplotipova HLA za svaku osobu, određivanje gena HLA usavršilo je točnost isključivanja očinstva, identifikacije osoba i sl. U isključivanju očinstva provjerava se je li muškarac mogao dati djetetu taj haplotip, a u identifikaciji osoba, primjerice posmrtnih ostataka, usporedbom roditeljskih (ili braće i sestara) i pokojnikovih gena HLA otkriva se identitet pokojnika (Andreis i sur., 2004.).

1.4.2. BIOLOŠKA VAŽNOST

Biološka važnost molekula HLA može se svesti na jednu rečenicu. Oni naime služe kao biljeg stanice, odnosno navode limfocit T na stanicu. Ako limfocit T ne prepozna kompleks antigena HLA i tuđeg antigena neće doći do specifične imunoreakcije (Andreis i sur., 2004.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Određivanje gena HLA tj. molekularna tipizacija HLA je skup i zahtjevan postupak te je iznalaženje postupaka kojima bi se to pojednostavilo i smanjilo troškove tipizacije je jedno od područja interesa znanstvenika na polju imunogenetike. S druge strane analiza mikrosatelita odnosno STR-a je jeftina i brza metoda te se stoga pokušavaju razviti protokoli kojima bi se uz pomoć analize mikrosatelita odredili aleli ili grupe alela na lokusima HLA.

Iz prije navedenog ciljevi ovog rada bili su :

1. Odrediti alele na aktivnim genima HLA-DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5 među skupinom ispitanika (N=53).
2. Analizirati alele mikrosatelita D6S2878 u ispitivanom uzorku.
3. Odrediti haplotipove HLA-DRB-D6S2878 među testiranim osobama.
4. Odrediti alele na pseudogenima unutar subregije HLA-DR analizom alela mikrosatelita D6S2878.
5. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima iz literature.

3. MATERIJALI I METODE











3.1. ISPITANICI

Ispitivanu skupinu sačinjavale su 53 zdrave nesrodne osobe, stanovnici grada Zagreba. Svim ispitanicima uzeto je 5 ml periferne krvi s EDTA kao antikoagulansom.

3.2. METODE ISTRAŽIVANJA

3.2.1. IZOLACIJA DNA

Izolacija DNA napravljena je pomoću komercijalnog seta (NucleoSpin®Blood, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Njemačka) koji se temelji na izolaciji DNA pomoću kolonica. Izolacijom s jednom kolonom iz 200µl pune krvi ispitanika dobije se se ≈100µl DNA. Metoda izolacije temelji se na lizi eritrocita zatim inkubaciji (70°C ≈10 min) s proteinazom K, ispiranju s puferima, te otapanju DNA u puferu za otapanje (*slika 6*). U slučaju kada smo od iste osobe trebali veću količinu DNA izolirali smo više kolonica. Izolirana DNA provjerava se na 1,5%-tnom agaroznom gelu s etidij-bromidom.

<div>Mini</div> <div>NucleoSpin® Blood</div>	
1. Liza uzorka krvi	 <div>200 µl blood 25 µl Pro.K 200 µl B3</div> <div>Mix</div>  <div>70°C 10 - 15 min</div>
2. Prilagođavanje uvjeta za vezanje DNA	210 µl ethanol
3. Vezanje DNA	 <div>Load all</div>  <div>1 min 11,000 x g</div> <div>—</div>
4. Ispiranje silikonske membrane	 <div>500 µl BW 600 µl B5</div> <div>1 ispiranje</div>  <div>1 min 11,000 x g</div> <div>2 ispiranje</div>  <div>1 min 11,000 x g</div>
5. Sušenje silikonske membrane	 <div>1 min 11,000 x g</div>
6. Eluiranje DNA visoke čistoće	 <div>100 µl BE (70°C)</div> <div>RT 1 min</div>  <div>1 min 11,000 x g</div>

Legenda:

B3 - pufer za lizu eritrocita

BW - pufer za ispiranje

B5 - pufer za ispiranje

BE - pufer za otapanje DNA

Slika 6. Metoda izolacije DNA iz periferne krvi pomoću kolonica

3.2.2. ODREĐIVANJE ALELA LOKUSA HLA-DRB1, DRB3, DRB4 I DRB5

Jedna od najbržih metoda određivanja alela HLA je metoda PCR-SSP (engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers) kojom se uz pomoć enzima Taq polimeraze i specifičnih početnica umnažaju pojedini aleli HLA ili grupe alela HLA. Setove koje smo mi koristili su Olerup SSPTM (QIAGEN, Beč, Austrija).

Sama analiza može se provoditi na dvije razine, nisko i visoko razlučivanje, odnosno određivanje skupine alela (tipizacija na dvije znamenke, tzv nisko razlučivanje, engl. “low resolution”) ili samo jednog alela (tipizacija na četiri znamenke, tzv. visoko razlučivanje, engl. “high resolution”). Za analizu lokusa DRB1 “low resolution” koristi se set koji uključuje 24 različite reakcije, dok setovi za “high resolution” za svaku pojedinu skupinu alela variraju pa tako npr. za skupinu alela DRB1*01 postoje 16 različitih reakcija, za alele skupine DRB1*15 su 24 različite reakcije itd. Za tipizaciju alela lokusa DRB3 set sadrži 24 različite reakcije, za alele lokusa DRB4 set je od 12 različitih reakcija dok je za alele lokusa DRB5 set od 16 različitih reakcija. Svaka od reakcija specifična je za jedan ili grupu alela HLA.

U svakoj reakciji prisutne su dvije početnice koje su specifične za pojedini alel ili grupu alela. Obje su početnice u paru i konstruirane su tako da imaju 3' krajeve koji savršeno odgovaraju samo jednom alelu ili jednoj skupini alela, veličine su 15 – 25 pb, a identične su postraničnim sekvencama ciljanog odsječka DNA i kontrolni par početnica koji služi za provjeru učinkovitosti PCR umnažanja tj. da vidimo jesmo li u reakciju stavili sve sastojke. Prisutnost tog para potvrđuje da je izostanak specifičnog umnažanja u nekoj reakciji rezultat nedostatka alela u uzorku DNA, a ne loše izvedenog PCR-a. Zatim je potrebno pripremiti mješavinu za PCR koja se rasporedi u odgovarajući broj reakcija, ovisno o tome koji lokus želimo analizirati. Mješavina za PCR sadrži Olerup SSP mješavinu bez Taq polimeraze, zatim destiliranu vodu i enzim Taq polimerazu. Zatim se u svaku tubicu stavi 2µl izolirane DNA.

Za umnažanje ciljane DNA korišten je Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) ili GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD).

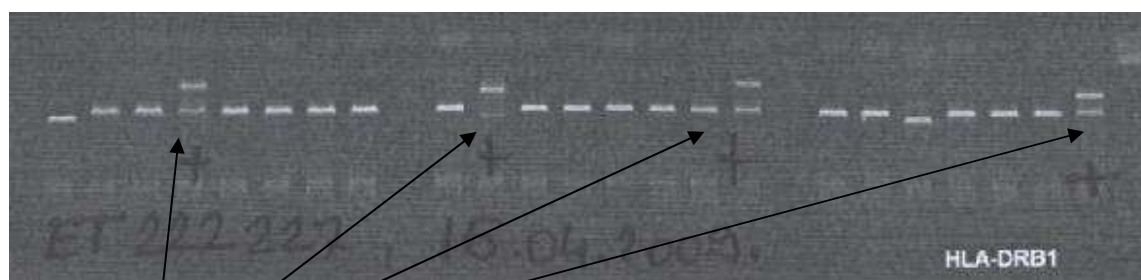
Uvjeti umnažanja DNA metodom PCR-SSP navedeni su u tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti umnažanja DNA metodom PCR-SSP

Vrijeme trajanja	Temperatura	Proces	Broj ciklusa
2 min	94°C	denaturacija	1
10 sek	94°C	denaturacija	10
60 sek	65°C	vezanje početnica i elongacija	
10 sek	94°C	denaturacija	20
50 sek	61°C	vezanje početnica	
30 sek	72°C	elongacija	

Umnožena DNA analizirana je na 1,5%-tnom agaroznom gelu s etidij-bromidom. Uvjeti elektroforeze su: voltaža – 110V, jakost – 400mA i vrijeme 20-25 minuta. Za određivanje veličine vrpce fragmenata DNA na gelu, uvijek se nanosi i komercijalni, molekularni biljeg poznatih molekularnih masa.

Na temelju pozitivnih reakcija određeni su aleli svakog od testiranih lokusa HLA (slika 7).



Legenda:

Reakcija broj 4, 10, 16 i 23 su pozitivne, a sve ostale su negativne.

Slika 7. Izgled gela s rezultatima tipizacije alela lokusa DRB1

Dobivene reakcije očitavaju se prema sljedećim kriterijima:

1. Negativna reakcija – reakcija u kojoj je prisutan samo produkt kontrolnih početnica tj. nema alel – specifičnih produkata.
2. Pozitivna reakcija – uz produkt kontrolnih početnica u nekim reakcijama prisutan je i alel – specifičan produkt. U takvoj reakciji prisutna su dva produkta tj. vidljive su dvije vrpce.
3. Lažno pozitivna reakcija – ako je rezultat amplifikacije vrpca slabijeg intenziteta ili ako produkt umnažanja veličinom ne odgovara očekivanom produktu. Takve reakcije mogu se zanemariti ako je jačina i jasnoća pozitivnih reakcija dobra. U nekim reakcijama može nastati tzv. “dimer početnica” koji se javlja iznad vrpce početnica, ali ispod mjesta specifičnog produkta. To je nejasna vrpca veličine manje od 80 pb. Pri interpretaciji rezultata treba paziti da se takva vrpca ne proglasi pozitivnom reakcijom.
4. Lažno negativna reakcija – vjerojatnost lažno negativne reakcije je vrlo mala, ako je kontrolna vrpca prisutna. Lažno negativan rezultat može se pojaviti u slučaju prisustva novog li još nedovoljno poznatog alela. Uzrok lažno negativnih reakcija može biti i neuspjelo umnažanje, loša kvaliteta DNA, varijacije temperature u samom aparatu za umnažanje ili neadekvatno kalibriranje uređaja.

3.2.3. ODREĐIVANJE ALELA MIKROSATELITA D6S2878

3.2.3.1. Umnažanje alela mikrosatelita D6S2878

Aleli mikrosatelita D6S2878 umnažaju se također pomoću enzima Taq polimeraze i jedinstvenog seta početnica. Taj set početnica obuhvaća obilježenu početnicu 5' HLA-DRB-STR_VIC, primarne strukture GAG AGC TTC ACA GTG CAG C i neobilježenu početnicu 3' HLA-DRB-STR, primarne strukture GAG AGG ATT CTA ATT GCT CAC.

Volumen reakcije za PCR-STR iznosio je 25 μ l, a sadržavao je destiliranu vodu, 1x PCR pufer II, 0,2 mM sva četiri deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP), 2,5mM MgCl₂, 0,1 μ l 5' početnice obilježene VIC-om, 0,1 μ l 3' neobilježene početnice i 1 jedinicu enzima Taq polimeraze (tablica 6).

Tablica 6. Mješavina za PCR

	Finalna koncentracija	Volumen (μ l)	Mješavina za PCR (x n)
PCR voda		16,3	16,3 x n
10x PCR pufer II	1x PCR pufer II	2,5	2,5 x n
5 mM dNTP	0,2 mM dNTP	1,0	1,0 x n
25 mM MgCl ₂	2,5 mM MgCl ₂	2,5	2,5 x n
10 μ l 5' početnice + VIC	0,1 μ l 5' početnice + VIC	0,25	0,25 x n
10 μ l 3' početnice	0,1 μ l 3' početnice	0,25	0,25 x n
5 jedinica/ μ l Taq polimeraze	1 jedinica/ μ l Taq polimeraze	0,2	0,2 x n

n - broj uzoraka

U svaku tubicu se razdijeli 23 μ l mješavine PCR te se doda 2 μ l odgovarajuće DNA, samo umnažanje izvedeno je pod uvjetima navedenim u tablici 7.

Tablica 7. Program umnažanja

Vrijeme trajanja	Temperatura	Proces	Broj ciklusa
5 min	94°C	inicijalna denaturacija	1
1 min	94°C	denaturacija	5
45 sek	58°C	vezanje početnica	
45 sek	72°C	elongacija	
45 sek	94°C	denaturacija	25
30 sek	58°C	vezanje početnica	
45 sek	72°C	elongacija	
30 min	72°C	finalna elongacija	1
∞	4°C		

3.2.3.2. Analiza dužine alela mikrosatelita D6S2878**Aparat za automatsko određivanje dužine fragmenata DNA**

Za sekvenciranje smo koristili četverokapilarni uređaj ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Sam instrument može očitati 23400 baza u jednom danu. Fluorescentno obilježeni fragmenti razdvajaju se elektroforezom u matriksu čija struktura omogućuje razdvajanje lanaca različitih po duljini za samo jedan nukleotid, a samo očitavanje provodi se sustavom koji uključuje laserski čitač, signali se automatski pohranjuju i kompjutorski obrađuju.

Priprema PCR produkta za analizu dužine fragmenata

Uzorci koji se stavljaju u uređaj za automatsko očitavanje moraju se prethodno pripremiti za sekvenciranje. Na pločicu koja se stavlja u uređaj za sekvenciranje stavlja se po 1µl PCR produkta koji se pomiješa sa standardnom mješavinom. Standardna mješavina sadrži 0,5µl GS350 Rox standarda i 15µl boje HiDy po uzorku, a za n uzoraka

pomnožimo standardnu mješavinu s n uzoraka. Zatim slijedi denaturacija uzoraka DNA zagrijavanjem 3 minute na 94°C te naglo hlađenje stavljanjem uzoraka na led.

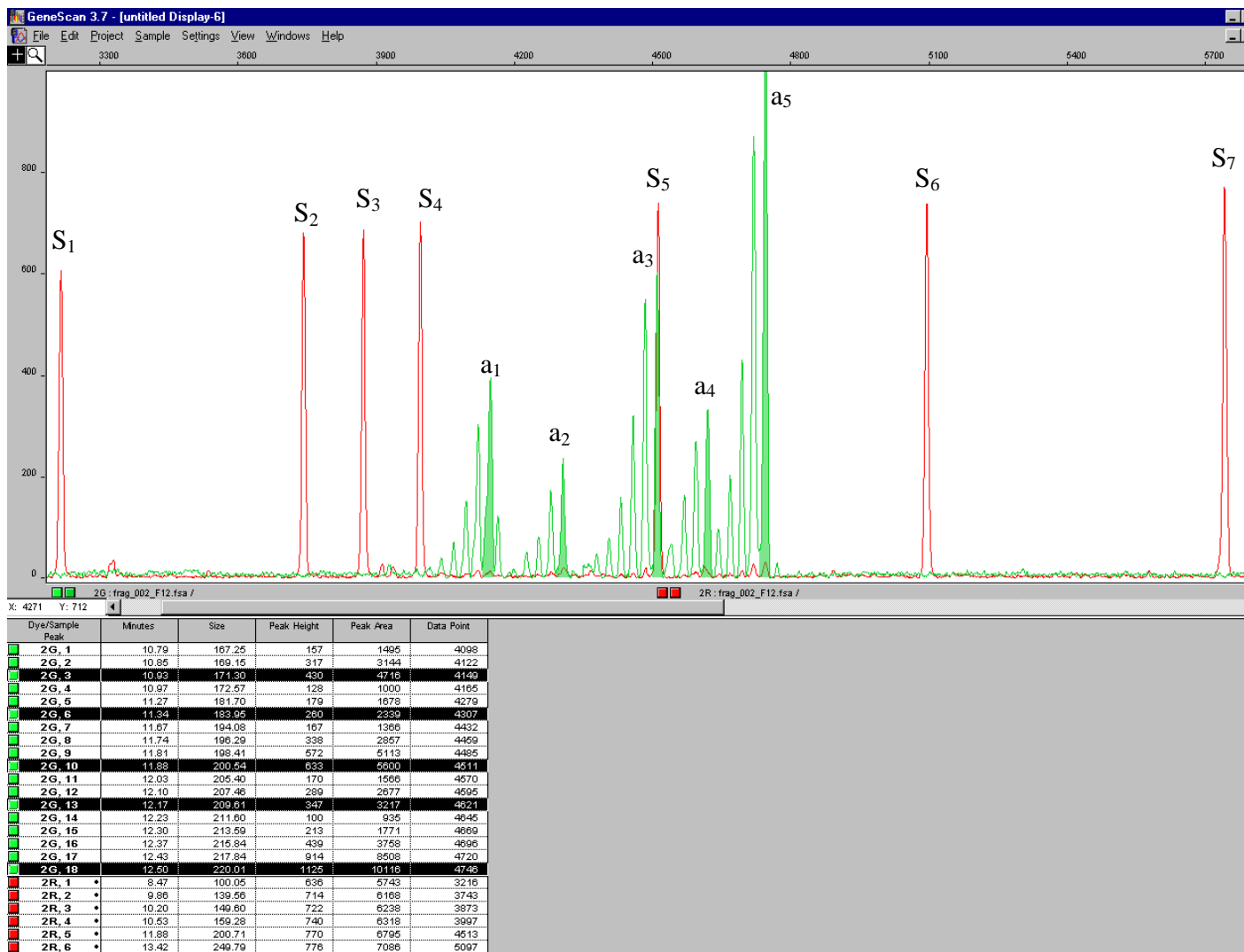
Korišteni standard (GS350 Rox) je standardni biljeg poznate dužine fragmenata obilježen bojom, a koristi se za analizu fragmenata duljine između 35 i 350 pb.

Elektroforeza

Tijekom elektroforeze aleli različite dužine različitim brzinama putuju kroz polimer. U našem radu koristili smo POP6. Kraći fragmenti DNA putuju brže, dok duži fragmenti DNA putuju sporije. Dužina fragmenata tj. alela određena je na temelju pobuđene fluorescencije koju registrira laser. Signali se automatski pohranjuju i kompjutorski obrađuju, a za obradu podataka koristi se program GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Na slici 8 prikazan je uzorak s alelima mikrosatelita D6S2878 analiziran programom GeneScan.

3.2.4. ANALIZA HAPLOTIPOVA HLA-DRB-D6S2878

S obzirom da smo imali nesrodne ispitanike analizu haplotipova HLA-DRB-D6S2878 nismo mogli napraviti segregacijom i pratiti nasljeđivanje od roditelja ili pak nasljeđivanje na djecu, analiza je napravljena na temelju literaturnih podataka (Doxiadis i sur., 2007.). Naime, u navedenom radu sekvencirani su svi haplotipovi i točno je određeno kojem alelu bilo aktivnog bilo pseudogena unutar subregije HLA-DRB odgovara koji alel D6S2878. Zahvaljujući tim podacima mi smo bili u mogućnosti iz naših rezultata slagati haplotipove HLA-DRB-D6S2878.



Legenda :

a₁ - a₅ aleli D6S2878

S - Rox standard (S₁ - 100 pb, S₂ - 139 pb, S₃ - 150 pb, S₄ - 160 pb, S₅ - 200 pb, S₆ - 250 pb i S₇ - 300 pb)

Slika 8. Prikaz jednog uzorka s alelima mikrosatelita D6S2878

4. REZULTATI

4.1. ANALIZA ALELA MIKROSATELITA D6S2878

Unutar skupine od 6 ispitanika koji su na lokusu DRB1 imali ili jedan od alela DRB1*01 ili DRB1*10 svi su imali po dva alela mikrosatelita D6S2878. Od dva alela D6S2878 kraći alel je uvijek bio dužine 136 pb, dok je duži varirao od 154 pb među osobama s alelima skupine DRB1*01 do 161 pb kod osobe koja je na lokusu DRB1 imala alel DRB1*1001 (tablica 8).

Tablica 8. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*01 i DRB1*10

DRB1*	D6S2878 (pb)		n
0101	136	154	4
0103	136	154	1
1001	136	161	1

n – broj uočenih ispitanika

U tablici 9 prikazano je svih 19 ispitanika koji su imali jedan od alela skupina DRB1*15 ili DRB1*16. Od deset osoba pozitivnih za alele DRB1*15, kod njih 7 smo otkrili o kojem je alelu riječ (DRB1*1501, *1502, *1503 i *1507) dok kod tri ispitanika nismo odredili podtip gena DRB1*15. Dužina najkraćeg alela D6S2878 varirala je od 152 pb kod osoba s alelom DRB1*1501, *1503, *1507 i *15, 154 pb kod osoba s alelom DRB1*15 do 174 pb kod osoba s alelom DRB1*1502. Dužina drugog alela mikrosatelita D6S2878 kod ispitanika ove skupine iznosila je od 180 pb do 202 pb, dok je dužina trećeg alela varirala od 186 pb do 220 pb. Među ispitanicima s alelima skupine DRB1*16 također smo uočili po tri alela mikrosatelita D6S2878. Od sva tri alela D6S2878 najkraći

alel uvijek je bio dužine 144 pb, dok su se dužine drugog i trećeg alela razlikovale od osobe do osobe. Najveći broj ispitanika imao je kombinaciju alela mikrosatelita D6S2878 176 pb i 184 pb.

Tablica 9. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*15 i DRB1*16

DRB1*		D6S2878 (pb)		n
1501	152	184	186	1
1501	152	188	190	1
1502	174	202	220	1
1502	174	192	204	1
1502	174	180	204	1
1503	152	190	-	1
1507	152	184	188	1
15	152	184	186	1
15	152	186	190	1
15	154	184	188	1
1601	144	178	184	1
1601	144	184	220	1
1601	144	176	184	2
1602	144	176	184	3
16	144	176	184	2

n – broj uočenih ispitanika

Analizom 21 ispitanika koji su na lokusu DRB1 imali jedan od alela skupina DRB1*03, DRB1*11 ili DRB1*12 otkrili smo da imaju u 20 slučajeva po dva različita alela mikrosatelita D6S2878, dok kod nikog nismo uočili tri različita alela (tablica 10). Kraći alel D6S2878 među osobama s alelom DRB1*0301 uvijek je bio dužine 172 pb, dok je duži alel iznosio 180 pb kod tri ispitanika, odnosno 212 pb kod samo jedne osobe. Među ispitanicima pozitivnim za jedan od alela grupe DRB1*11, samo jednoj osobi nismo napravili podtipizaciju i otkrili o kojem je subtipu riječ. Kod ispitanika s alelom DRB1*1201 duljine kraćeg alela D6S2878 bile su 200 pb i 206 pb, a dužeg alela 208 pb i 212 pb.

U tablici 11 prikazana je raspodjela alela D6S2878 za 20 ispitanika koji su na lokusu DRB1 imali jedan od alela skupine DRB1*13 ili DRB1*14. Svi su ispitanici imali po dva alela D6S2878. Među osobama s jednim od 4 različita alela DRB1*13 dužina kraćeg alela iznosila je od 180 pb do 194 pb, a duži alel D6S2878 bio je u rasponu dužine od 188 pb, preko 194 pb do 210 pb. Unutar ove skupine uočili smo kod dva ispitanika istu kombinaciju alela na testiranim lokusima i to za kombinacije: DRB1*1301, D6S2878 180 pb i 194 pb i kombinaciju DRB1*1301, D6S2878 186 pb i 188 pb. Analiza alela D6S2878 među osobama pozitivnim za alel DRB1*1401 pokazala je također različitu dužinu kraćeg alela (186 pb do 198 pb) kao i nešto kraći raspon dužeg alela D6S2878 od samo 4 pb (206 pb i 210 pb).

Tablica 10. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*03, DRB1*11 i DRB1*12

DRB1*	D6S2878 (pb)		n
0301	172	180	3
0301	172	210	1
0301	172	212	1
1101	192	212	1
1101	186	186	1
1101	188	214	1
1102	186	188	1
1103	194	212	1
1103	192	208	1
1103	192	214	1
1104	186	188	1
1104	186	206	1
1104	191	210	1
1104	180	186	1
1111	188	214	1
11	184	206	1
1201	200	212	1
1201	206	208	1
1201	206	212	1

n – broj uočenih ispitanika

Tablica 11. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*13 i DRB1*14

DRB1*	D6S2878 (pb)		n
1301	186	188	2
1301	180	194	2
1301	186	194	1
1301	194	206	1
1301	194	210	1
1301	192	208	1
1302	180	196	1
1302	186	188	1
1302	188	206	1
1302	194	214	1
1302	188	214	1
1303	180	194	1
1305	188	212	1
1305	186	210	1
1401	192	210	1
1401	186	210	1
1401	192	206	1
1401	198	206	1

n – broj uočenih ispitanika

Istraživanjem grupe od 18 ispitanika koji su imali jedan od alela serološke skupine HLA-DR53 (DRB1*04, DRB1*07 i DRB1*09) utvrđeno je da su svi imali po tri alela mikrosatelita D6S2878. Najkraći alel D6S2878 uvijek je bio 135 pb. Dužina drugog alela D6S2878 varirala je od 176 pb kod osoba s alelima DRB1*0401, *0403, *0404 i *0405, zatim 178 pb kod osoba s alelima DRB1*0401, *0402, *0403 i *0404 do 180 pb i 182 pb kod dva ispitanika s alelom DRB1*0407. Također smo i za treći alel uočili različite dužine od 180 pb do 196 pb. Dužina drugog alela D6S278 među ispitanicima s alelom DRB1*0701 uvijek je bila 149 pb, a dužina trećeg alela je varirala od 170 pb, preko 176 pb do 180 pb. Unutar skupine HLA-DR53 imali smo samo jednu osobu s alelom DRB1*0901 što je bilo i za očekivati s obzirom na malu zastupljenost tog alela u našoj populaciji (< 1%), dužina drugog alela D6S2878 bila je 170 pb, a trećeg alela 178 pb (tablica 12).

Tablica 12. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*04, DRB1*07 i DRB1*09

DRB1*	D6S2878 (pb)			n
0401	135	176	180	1
0401	135	178	180	1
0402	135	178	194	1
0403	135	176	194	1
0403	135	176	196	1
0403	135	178	192	1
0404	135	178	192	1
0404	135	178	196	1
0404	135	176	194	1
0405	135	176	180	1
0405	135	176	192	1
0407	135	182	184	1
0407	135	180	184	1
0701	135	149	176	1
0701	135	149	170	2
0701	135	149	180	1
0901	135	170	178	1

n – broj uočenih ispitanika

U tablici 13 prikazana je skupina od četiri ispitanika koji su na lokusu DRB1 imali alel DRB1*08 i svi imaju samo jedan alel mikrosatelita D6S2878. Od tog broja polovina ispitanika imala je alel D6S2878 - 170 pb, a kod preostala dva ispitanika s alelom DRB1*0802, odnosno s alelom DRB1*0804 uočeni su aleli mikrosatelita D6S2878 od 176 pb.

Tablica 13. Aleli mikrosatelita D6S2878 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1*08

DRB1*	D6S2878 (pb)	n
0801	170	2
0802	176	1
0804	176	1

n – broj uočenih ispitanika

4.2. ODREĐIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-DRB-D6S2878

Sljedeći cilj ovog rada bio je da na temelju dobivenih rezultata dužine alela mikrosatelita D6S2878 složimo haplotipove tj. vidimo koji alel D6S2878 odgovara kojem genu HLA-DRB. U samom istraživanju odredili smo samo alele na funkcionalnim genima (DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5), a alele na pseudogenima (DRB6 i DRB7) pretpostavili smo na temelju literaturnih podataka.

Haplotip HLA-DR1 obuhvaća alele DRB1*01 i *10. Uz ovaj haplotip dolazi funkcionalni gen DRB1 i pseudogen DRB6. Na osnovu prethodnog objašnjenja, utvrdili smo da kraći aleli (154 pb i 161 pb) odgovaraju alelima lokusa DRB1, dok dužina alela D6S2878 od 136 pb odgovara alelu DRB6*0101 na pseudogenu DRB6 (tablica 14).

Tablica 14. Aleli mikrosatelita D6S2878 u haplotipovima HLA-DR1

DRB1*	D6S2878 (pb)	#<i>DRB6*</i>	D6S2878 (pb)	n
0101	154	<i>0101</i>	136	4
0103	154	<i>0101</i>	136	1
1001	161	<i>0101</i>	136	1

n – broj uočenih haplotipova; # - u italicu su prikazani pretpostavljeni aleli na pseudogenu DRB6

U haplotipove skupine HLA-DR51 ubrajamo alele DRB1*15 i DRB1*16, poznato je da ti haplotipovi nose dva funkcionalna gena DRB1 i DRB5 te jedan pseudogen DRB6. Analiza alela D6S2878 pokazala je da najkraći aleli dužine 144 pb, odnosno 152 pb, 154 pb i 174 pb pripadaju alelu DRB6*0202, odnosno DRB6*0201 na pseudogenu DRB6 (tablica 15). Prema rezultatima našeg istraživanja uočili smo da na lokusu DRB5 alel DRB5*0101 dolazi s 3 različita alela D6S2878 dužine 184 pb, 190 pb i 192 pb, a alel DRB5*0102 s dva različita alela dužine od 184 pb i samo kod jednog ispitanika od 220 pb, dok kod dvoje ispitanika aleli na DRB5 lokusu nisu bili određeni. Za alele na DRB1 lokusu uočeno je da su dužine alela D6S2878 duže, osim u jednom slučaju, u odnosu na alele mikrosatelita D6S2878 na lokusu DRB5.

Tablica 15. Aleli mikrosatelita D6S2878 u haplotipovima HLA-DR51

DRB1*	D6S2878 (pb)	DRB5*	D6S2878 (pb)	#<i>DRB6*</i>	D6S2878 (pb)	n
1501	186	0101	184	<i>0201</i>	152	1
1501	190	0101	188	<i>0201</i>	152	1
1502	202	0102	220	<i>0201</i>	174	1
1502	204	0101	192	<i>0201</i>	174	1
1502	204	0101	180	<i>0201</i>	174	1
1503	190	0101	190	<i>0201</i>	152	1
1507	188	0101	184	<i>0201</i>	152	1
15	186	0101	184	<i>0201</i>	152	1
15	186	0101	190	<i>0201</i>	152	1
15	188	0101	184	<i>0201</i>	154	1
1601	178	0102	184	<i>0202</i>	144	1
1601	184	nd	220	<i>0202</i>	144	1
1601	176	0102	184	<i>0202</i>	144	2
1602	176	0102	184	<i>0202</i>	144	3
16	176	nd	184	<i>0202</i>	144	2

n – broj uočenih haplotipova; nd – nije određen; # - u italiku su prikazani pretpostavljeni aleli na pseudogenu DRB6

Unutar skupine haplotipova HLA-DR52 su aleli DRB1*03, *11, *12, *13 i *14 koji imaju po dva funkcionalna gena DRB1 i DRB3 te pseudogen DRB2 (Grubić i sur., 2000.). Iz prethodne tvrdnje vidljivo je da bi se za haplotipove ove skupine trebalo uočiti tri različita alela D6S2878, ali uočena su samo dva, jer pseudogenu DRB2 nedostaje egzon 2 pa tako i intron 2 u kojem se nalazi mikrosatelit D6S2878, pa se pseudogen DRB2 ne može umnožiti setom početnica koje smo mi koristili, pa tako i izostaje fragment DNA koji bi odgovarao alelu DRB2. Na temelju rezultata iz literature i naših rezultata ovog istraživanja uočili smo da na lokusu DRB3 alel DRB3*0101 uvijek dolazi s alelom D6S2878 - 180 pb, a alel DRB3*0301 s alelom od 186 pb. Alel DRB3*0202 dolazio je s pet različitih alela dužine od 206 pb do 214 pb. U haplotipovima gdje je na lokusu DRB3 bio alel DRB3*0301, alel mikrosatelita D6S2878 bio je manje dužine od alela koji je uočen za alele lokusa DRB1 (tablica 16). Takav primjer je haplotip HLA-DRB1*1101, D6S2878-188 pb, DRB3*0301, D6S2878-186 pb.

Tablica 16. Aleli mikrosatelita D6S2878 u haplotipovima HLA-DR52

DRB1*	D6S2878 (pb)	DRB3*	D6S2878 (pb)	n
0301	172	0101	180	3
0301	172	0202	210	1
0301	172	0202	212	1
1101	192	0202	212	1
1101	186	0301	186	1
1101	188	0202	214	1
1102	188	0301	186	1
1103	194	0202	212	1
1103	192	0202	208	1
1103	192	0202	214	1
1104	188	0301	186	1
1104	186	0202	206	1
1104	191	0202	210	1
1104	186	0101	180	1
1111	188	0202	214	1
11	184	0202	206	1
1201	200	0202	212	1
1201	206	0202	208	1
1201	206	0202	212	1

n – broj uočenih haplotipova

U slučaju kada je na lokusu uočen alel DRB3*0101 ili DRB3*0202, dužina alela D6S2878 koja odgovara tom lokusu nije bila uniformna tj. bila je manja ili veća u odnosu na alele D6S2878 koji su vezani uz lokus DRB1.

Iz podataka prikazanih u tablici 17 vidljivo je da je alel DRB3*0101 i ovdje dolazio s alelom mikrosatelita D6S2878 dužine 180 pb, a alel DRB3*0301 s alelom D6S2878 186 pb. Osim ova dva alela na lokusu DRB3 uočena su još dva alela DRB3*0201 i *0202 koji su dolazili s različitim alelima lokusa D6S2878.

U haplotipsku skupinu HLA-DR53 pripadaju aleli DRB1*04, *07 i *09. Na tim haplotipovima dolaze po dva funkcionalna gena DRB1 i DRB4, kao i jedan pseudogen DRB7. Rezultati prikazani u tablici 18 ukazuju da je alel D6S2878 od 135 pb odgovarao alelu pseudogena DRB7*0101 i to je bio najkraći alel u ovoj grupi haplotipova. Na lokusu DRB4 svi testirani ispitanici imali su alel DRB4*0101 kojem su pripadali različiti aleli mikrosatelitskog lokusa D6S2878 (od 176 pb do 182 pb). Zanimljivo je spomenuti da je jedino među haplotipovima alela DRB1*0701 alel koji odgovara lokusu DRB1 bio kraći od onog za lokus DRB4.

Za haplotipove skupine HLA-DRB1*08 nismo napravili tablicu haplotipova jer ti haplotipovi imaju samo jedan aktivni gen, gen DRB1, a kao što vidimo iz tablice 13 imaju samo jedan alel mikrosatelita D6S2878.

Tablica 17. Aleli mikrosatelita D6S2878 u haplotipovima HLA-DRB1*13 i *14

DRB1*	D6S2878 (pb)	DRB3*	D6S2878 (pb)	n
1301	188	0301	186	2
1301	194	0101	180	2
1301	194	0301	186	1
1301	194	0201	206	1
1301	194	0201	210	1
1301	192	0201	208	1
1302	196	0101	180	1
1302	188	0301	186	1
1302	188	0201	206	1
1302	194	0201	214	1
1302	188	0201	214	1
1303	194	0101	180	1
1305	188	0201	212	1
1305	186	0201	210	1
1401	192	0202	210	1
1401	186	0202	210	1
1401	192	0202	206	1
1401	198	0202	206	1

n – broj uočenih haplotipova

Tablica 18. Aleli mikrosatelita D6S2878 u haplotipovima HLA-DR53

DRB1*	D6S2878 (pb)	DRB4*	D6S2878 (pb)	<i>#DRB7*</i>	D6S2878 (pb)	n
0401	180	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0401	180	0101	178	<i>0101</i>	135	1
0402	194	0101	178	<i>0101</i>	135	1
0403	194	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0403	196	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0403	192	0101	178	<i>0101</i>	135	1
0404	192	0101	178	<i>0101</i>	135	1
0404	196	0101	178	<i>0101</i>	135	1
0404	194	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0405	180	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0405	192	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0407	184	0101	182	<i>0101</i>	135	1
0407	184	0101	180	<i>0101</i>	135	1
0701	149	0101	176	<i>0101</i>	135	1
0701	149	0101	170	<i>0101</i>	135	2
0701	149	0101	180	<i>0101</i>	135	1
0901	170	0101	178	<i>0101</i>	135	1

n – broj uočenih haplotipova; [#] - u italiku su prikazani pretpostavljeni aleli na pseudogenu DRB7

5. RASPRAVA

Ovaj rad je dio međunarodnog projekta «Definition of DRB haplotypes by a simplified DRB-STR microsatellite typing» u sklopu «15th International Histocompatibility and Immunogenetics Workshop» (Brazil, 2008.) kojim se uz pomoć alela mikrosatelita D6S2878 pokušava odrediti haplotipove HLA-DRB. Time bi se mogao ubrzati postupak tipizacije gena HLA-DRB te uštediti znatna materijalna sredstva. Naime, sama tipizacija HLA je skup postupak dok je analiza mikrosatelita, odnosno lokusa STR, brza i jeftina metoda. Samo određivanje alela lokusa HLA-DRB uz pomoć analize mikrosatelita D6S2878 moglo bi naći svoju važnu primjenu u slučajevima kada unutar velikog broja uzoraka probirom možemo izuzeti uzorke koji nemaju određene alele lokusa HLA-DRB1. To je naročito važno u slučajevima transplantacije krvotvornih matičnih stanica kada imamo nekoliko potencijalnih davatelja identičnih s primateljem za alele HLA razreda I te ih je potrebno tipizirati kako bi utvrdili postoji li davatelj identičan i za alele lokusa HLA-DRB1. Druga mogućnost primjene je da bude metoda probira tj. da je koristimo za eliminaciju uzoraka koji ne odgovaraju potencijalnom primatelju kako bi se izbjegla kompletna tipizacija.

Jedan od takvih mikrosatelita je D6S2878 koji se nalazi unutar svih funkcionalnih gena HLA-DRB (DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5) kao i pseudogena DRB6 i DRB7. Može se umnožiti pomoću jedinstvenog seta početnica i predstavlja potencijalno dobar genetski biljeg za određivanje haplotipova HLA-DRB. Što znači da će broj alela mikrosatelita D6S2878 u jednom haplotipu biti različit od osobe do osobe i ovisit će o tome koje osoba ima gene DRB u svoja dva haplotipa HLA. Odnosno, osoba minimalno može imati 2 alela D6S2878 i to u slučaju kada na oba haplotipa HLA ima na lokusu DRB1 alel DRB1*08. S druge strane osoba može imati maksimalno 6 alela D6S2878 što je slučaj kada ima na oba kromosoma 6 haplotipove DR51 ili DR53 ili pak na jednom kromosomu 6 haplotip DR51 a na drugom haplotip DR53.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su za alele DRB1*01 i *10 uočeni aleli D6S2878 (154 pb i 161 pb) u skladu s rezultatima istraživanja provedenim u okviru projekta „Definition of DRB haplotypes by simplified DRB-STR microsatellite typing“

kao i za pseudogen DRB6 (136 pb) koji je prisutan na tim haplotipovima. Međutim, treba reći da kod četiri uzorka iz ove skupine (tablica 19) nismo otkrili po dva alela D6S2878 bilo da se radilo o alelu D6S2878 za pseudogen DRB6 ili alel D6S2878 svojom dužinom nije odgovarao alelima DRB1*01 i *10. Dužina alela D6S2878 iznosila je 200 pb i 206 pb.

Usporedba naših rezultata za haplotipove serološke skupine HLA-DR51 koji obuhvaćaju alele DRB1*15 i DRB1*16 nije pokazala odstupanja. Kod svih osoba s ovim haplotipom otkrili smo po tri različita alela D6S2878 osim kod jedne osobe koja je imala alel D6S2878-190 pb i alel D6S2878-152 pb. Objašnjenje za to leži u činjenici da za alele DRB1*15 dužina alela D6S2878 je bila od 186 pb do 204 pb, a za alele lokusa DRB5 od 184 pb do čak 220 pb. Iz tog razloga u nekim slučajevima može doći da osoba ima za oba gena DRB istu dužinu alela mikrosatelita D6S2878. Dužina alela D6S2878 za alel DRB1*15 u našim rezultatima iznosila je od 186 pb do 204 pb, a u literaturi s kojom smo uspoređivali 184 pb do 204 pb. Uvidom u tablicu 15 vidimo da kod tri ispitanika nismo odredili podtip gena DRB1*15, na temelju otkrivenih dužina alel D6S2878 (186 pb) možemo pretpostaviti da je riječ o podtipu DRB1*1501.

Skupini alela DRB1*16 odgovarala je dužina alela mikrosatelita D6S2878 176 pb ili 178 pb ili 184 pb.

Zanimljivo je spomenuti razliku između DRB1*15 i DRB1*16 haplotipova po pitanju dužine alela D6S2878 za pseudogen DRB6. Iz tablice 15 možemo vidjeti da se jasno razlikuje dužina fragmenta DNA između ove dvije podgrupe haplotipova serološke skupine HLA-DR51 s obzirom na pseudogen DRB6. Alel D6S2878 u pseudogenu DRB6 kod DRB1*16 pozitivnih haplotipova je uvijek bio dužine 144 pb, dok je kod DRB1*15 pozitivnih osoba dužina alela bila od 152 pb pa sve do 174 pb. To nam ukazuje na mogućnost da uz pomoć dužine tog alela mikrosatelita D6S2878 možemo razlikovati DRB1*15 pozitivne od DRB1*16 pozitivnih osoba. Istovremeno literaturni podaci za alele lokusa DRB5 govore o dužinama alela lokusa D6S2878 od 180 pb do 222 pb što je u skladu i s našim nalazima (Doxiadis i sur., 2007.).

Analiza haplotipske skupine HLA-DR52 koja uključuje alele DRB1*03, *11, *12, *13 i *14 također nije pokazala odstupanja u dužini alela D6S2878 u usporedbi s literaturom (Doxiadis i sur., 2007.). Najveći broj haplotipova nosio je alel DRB1*03 i

jedina razlika među njima odnosila se na dužinu alela D6S2878 koji odgovara lokusu DRB3 što je i razumljivo s obzirom da su na tom lokusu bila uočena dva različita alela (DRB3*0101 s alelom D6S2878-180 pb i DRB3*0202 s dužim alelima D6S2878-210 pb odnosno D6S2878-212 pb). Ovaj nalaz ide u prilog spoznaji o haplotipovima DRB1*0301 kao najkonzerviranijim haplotipovima unutar regije HLA razreda II (Begovich i sur., 1992., Grubić i sur., 1999.).

I unutar skupine haplotipova HLA-DR52 kod 3 ispitanika nismo odredili po dva alela D6S2878 već samo po jedan. Objašnjenje može biti da su osobe homozigoti za te alele tj. da i za gen DRB1 i za gen DRB3 imaju isti alel D6S2878 što se može jedino dokazati sekvenciranjem. Na temelju dostupnih podataka iz literature naši rezultati su u skladu s dužinama alela za te lokuse HLA.

Haplotipska skupina HLA-DR53 s pripadajućim alelima (DRB1*04, *07 i *09) također je imala po 3 alela D6S2878 kod svih testiranih ispitanika. Sve su dužine alela D6S2878 u skladu s podacima iz literature, za razliku od haplotipova HLA-DR51 u ovim haplotipovima prisutni pseudogen DRB7 uvijek ima istu dužinu alela D6S2878-135 pb. Upravo je taj alel onaj po kojem ovu skupinu haplotipova možemo razlikovati od svih ostalih.

Jedina haplotipska skupina HLA-DRB koja je imala samo jedan alel mikrosatelita D6S2878 je skupina HLA-DRB1*08. Uočena dužina tog alela od 170 pb i 176 pb također je bila u skladu s podacima iz literature (Doxiadis i sur., 2007.).

Tablica 19. Uzorci koji nisu imali ili odgovarajući broj alela D6S2878 ili aleli nisu bili odgovarajuće dužine

DRB1*	Alel D6S2879 (pb)		n
0101	136	200	1
0102	-	206	1
1001	136	-	2
1101	-	204	1
1101	198	-	1
1302	186	-	1
1601	144	-	184

n- broj uočenih haplotipova

Kao što mikrosatelit D6S2878 predstavlja potencijalno dobar biljeg za tipizaciju gena HLA-DRB ne samo niskog, već u nekim slučajevima i visokog razlučivanja, današnji trendovi su da se pronade genetski biljeg, odnosno mikrosatelit HLA za tipizaciju alela HLA razreda I, osobito lokusa HLA-B. S obzirom na veliki polimorfizam alela na lokusu HLA-B već bi velika ušteda na vremenu bila i mogućnost da se odredi kojoj CREG skupini skupini pripada alel lokusa HLA-B. Time bi se izbjeglo provođenje kompletne tipizacije na velikom broju uzoraka.

Moguće primjene tipizacije DRB-STR su u istraživanjima povezanosti ove regije HLA s brojnim bolestima, populacijskim istraživanjima, evoluciji, ali nadasve u tipizaciji velikog broja uzoraka nesrodnih davatelja u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.

6. ZAKLJUČAK

1. Metoda DRB-STR je reproducibilna i vrlo precizna te može dati odgovor na brojna pitanja o raznolikosti alela i haplotipova HLA-DRB.
2. Analiza haplotipova HLA-DRB1*01 i *10 pokazala je prisutnost po dva alela mikrosatelita D6S2878 na svakom od testiranih haplotipova, kraći alel D6S2878-136 pb je povezan s alelom pseudogena DRB6, a duži aleli D6S2878-154 pb i D6S2878-161 pb odgovaraju za alele aktivnog gena DRB1.
3. Na haplotipovima HLA-DR51 (DRB1*15 i DRB1*16) uvijek su bila prisutna po tri alela mikrosatelita D6S2878 za gene DRB1, DRB5 i DRB6. Aleli D6S2878-152 pb i D6S2878-174 pb odgovarali su alelu pseudogena DRB6*0201, dok je alel D6S2878-144 pb odgovarao alelu DRB6*0202. Aleli D6S2878 za aktivne gene varirali su u dužini od 176 pb do 220 pb.
4. Haplotipovi HLA-DR52 (DRB1*03, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 i DRB1*14) imali su po dva alela D6S2878 po jedan za gen DRB1 i DRB3.
5. Tri alela mikrosatelita D6S2878 uočena su kod osoba s haplotipom HLA-DR53 (DRB1*04, DRB1*07 i DRB1*09). Najkraći alel D6S2878-135 pb odgovara alelu pseudogena DRB7, dok je dužina alela D6S2878 za alel DRB4*0101 varirala od 170 pb do 182 pb. Za alele skupine DRB1*04 dužina alela D6S2878 iznosila je od 180 pb do 196 pb.
6. Haplotipovi HLA-DRB1*08 uvijek su imali samo jedan alel mikrosatelita D6S2878 dužine od 170 pb do 176 pb.
7. Haplotipovi DRB1*01, DRB1*0301 i DRB1*0701 pokazali su najmanji polimorfizam alela D6S2878 što je u skladu s njihovom visokom konzerviranošću.

8. Usporedba naših rezultata s podacima iz literature nije pokazala značajnija odstupanja u dužini alela mikrosatelita D6S2878 između testiranih haplotipova.

9. Istraživanje je potrebno nastaviti na većem broju ispitanika kako bi se stekla preciznija slika o razlikama alela D6S2878 između pojedinih alela DRB1 unutar iste podgrupe gena ovog lokusa.

7. LITERATURA

1. Ando A, Shigenagari A, Naruse TK et al. (1997): Triplet repeat polymorphism within the NOTCH4 gene located near the junction of the class II and class III regions in narcolepsy. *Tissue Antigens* **50**: 646-649.
2. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. (2004): *Imunologija*, Zagreb, Medicinska naklada.
3. Begovich AB, McClure GR, Suraj V et al. (1992): Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J. Immunol.* **148**: 249-258.
4. Bergstrom T, Engkvist H, Erlandsson R et al. (1999): Tracing the origin of HLA-DRB1 alleles by microsatellite polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 1709-1718.
5. Doxiadis GGM, de Groot N, Claas FHJ, Doxiadis IIN, van Rood JJ (2007): A highly divergent microsatellite facilitating fast and accurate DRB haplotyping in humans and rhesus macaques. *PNAS* **104**: 8907-8912.
6. Doxiadis GGM, de Groot N, Dauber E et al. (2008): High resolution definition of HLA-DRB haplotypes by a simplified microsatellite typing technique: Project of the 15th International Histocompatibility and Immunogenetics Workshop and Conference, Rio de Janeiro, Brazil. *Tissue Antigens* 2009 (u tisku).
7. Gorraud PA, Mano S, Barnetche T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A (2004): Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* **64**: 543-555.

8. Graham RR, Ortman WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA et al. (2002): Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 543-553.
9. Grubić Z, Žunec R, Kaštelan A. (1999): Polymorphism of HLA-DR52 associated haplotypes in a Croatian population. *Eur. J. Immunogenet.* **26**: 385-387.
10. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. (2000): Polymorphism of HLA-A, B, DRB1 and DQB1 haplotypes in the Croatian population. *Eur. J. Immunogenet.* **27**: 47-51.
11. Singal DP, Li J, Ye M, Lei K, D6S273 microsatellite polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **52**: 353-358.
12. Snell GD (1980): Studies in histocompatibility, Nobel lecture
13. Yabuki K, Ota M, Goto K et al. (1999): Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27-positive and -negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum. Immunol.* **60**: 83-86.

ELEKTRONSKI IZVORI:

1. <http://hla.alleles.org>